

Docket No.: 04703/0202932-USO  
(PATENT)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Kenichi Nagamine et al.

Application No.: Not Yet Assigned

Confirmation No.: N/A

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: N/A

For: ANTIOXIDANT, SKIN PREPARATION FOR  
EXTERNAL USE, COSMETIC AND FOOD

Examiner: Not Yet Assigned

**AFFIRMATION OF PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

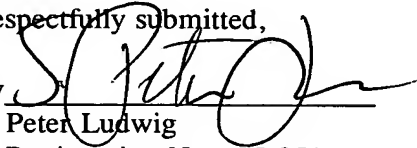
Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-341191	November 25, 2002

A certified copy of the aforesaid Patent Application was received by the International Bureau on December 11, 2003 during the pendency of International Application No. PCT/JP2003/014885. A copy of Form PCT/IB/304 is enclosed.

Dated: May 16, 2005

Respectfully submitted,

By   
S. Peter Ludwig

Registration No.: 25,351

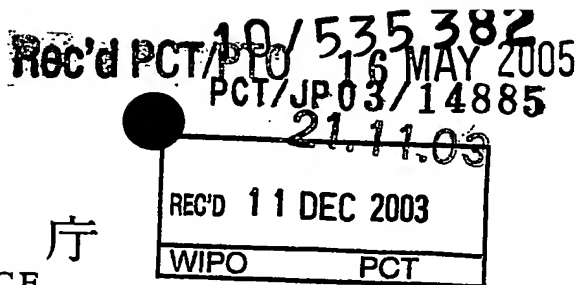
(212) 527-7700

(212) 527-7701 (Fax)

Attorneys/Agents For Applicant



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年11月25日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-341191  
[ST. 10/C]: [JP2002-341191]

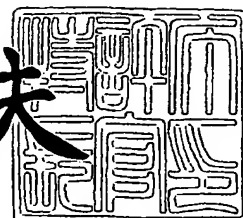
出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ニチレイ

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-452

【提出日】 平成14年11月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東村山市久米川町 1-52-14 株式会社ニチ  
レイ バイオサイエンス開発センター内

【氏名】 永峰 賢一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東村山市久米川町 1-52-14 株式会社ニチ  
レイ バイオサイエンス開発センター内

【氏名】 林 美希

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東村山市久米川町 1-52-14 株式会社ニチ  
レイ バイオサイエンス開発センター内

【氏名】 山崎 かおり

【特許出願人】

【識別番号】 000134970

【氏名又は名称】 株式会社ニチレイ

【代理人】

【識別番号】 100081514

【弁理士】

【氏名又は名称】 酒井 一

【選任した代理人】

【識別番号】 100082692

【弁理士】

【氏名又は名称】 蔵合 正博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007010

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0201808

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤、皮膚外用剤、化粧品及び食料品

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アセロラ種子の抽出物を有効成分として含む抗酸化剤。

【請求項2】 アセロラ種子の抽出物が、ケルシトリンを含む請求項1記載の抗酸化剤。

【請求項3】 アセロラ種子の抽出物を有効成分として含むコラゲナーゼ活性阻害剤。

【請求項4】 アセロラ種子の抽出物を有効成分として含むヒアルロニダーゼ活性阻害剤。

【請求項5】 請求項1又は2記載の抗酸化剤、請求項3記載のコラゲナーゼ活性阻害剤、請求項4記載のヒアルロニダーゼ活性阻害剤の少なくとも1種を含むことを特徴とする皮膚外用剤。

【請求項6】 請求項1又は2記載の抗酸化剤、請求項3記載のコラゲナーゼ活性阻害剤、請求項4記載のヒアルロニダーゼ活性阻害剤の少なくとも1種を含むことを特徴とする化粧品。

【請求項7】 請求項1又は2記載の抗酸化剤を含むことを特徴とする食料品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アセロラ種子の抽出物を有効成分とする抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤、並びにこれらのいずれかを用いた皮膚外用剤、化粧品及び食料品に関する。

【0002】

【従来の技術】

食品、化粧品、医薬品等の物品において油脂類を含む場合、その貯蔵、保存、加工の過程において最も問題になるのは、空気中の酸素による油脂成分等の酸化

や過酸化である。とりわけ、油脂中に含まれるリノール酸、リノレン酸等の不飽和脂肪酸は、酸素により容易に過酸化されて過酸化脂質やフリーラジカルを生成し、更には発癌性物質をも生成することが知られている。このような酸化や過酸化が起こると、着色、変色、変性、異臭あるいは栄養価の有効性の低下ばかりか、毒物の生成等が生じ、製品の品質の劣化を招く。

そこで、前述の不飽和脂肪酸の酸化及び過酸化を抑制し、製品の品質の劣化を防ぐために従来から種々の抗酸化剤が用いられている。抗酸化剤は、酸化の際に生ずるペルオキシドラジカルに作用し、酸化の連鎖反応を停止させるか、あるいはフリーラジカルに作用して酸化反応を停止させる。抗酸化剤としては、従来から、例えば、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)やブチルヒドロキシトルエン(BHT)等の合成抗酸化剤が一般に用いられている。ところが、近年、合成抗酸化剤の使用が増えるにつれその安全性が問題にされ、消費者の拒否反応が強くなってきていると共にその使用量も減っている。また、これら合成抗酸化剤は、油溶性であるため水溶液への使用が困難である。

一方、安全性の高い天然物由来の抗酸化剤としては、例えば、天然ビタミンE( $\alpha$ -トコフェロール)、ビタミンC等が知られている。しかし、これら天然物由来の抗酸化剤は、極端な脂溶性又は水溶性という性質を有しているため、その利用には限度が生じる。また、その活性が長時間安定に持続しない等の欠点もある。

従って、抗酸化活性が強く、水への溶解性に富み、しかも抗酸化活性が長時間安定である天然物由来の抗酸化剤が強く求められている。

また、皮膚の水分保持、柔軟性、弾力性に作用する物質として、コラーゲンやヒアルロン酸などが知られている。コラーゲンは、皮膚では真皮の90%を占め、真皮全体に分布しており、皮膚に適度な弾性及び強度を保持させる。また、ヒアルロン酸は、皮膚、関節液、硝子体、靱帯など生体に広く分布しており、皮膚において、細胞の接着、細胞の保護、皮膚組織の形成、組織の水分保持、柔軟性の維持などを担っている。生体内でコラーゲンを分解する酵素としてコラゲナーゼ、ヒアルロン酸を分解する酵素としてヒアルロニダーゼが知られているが、これらによってコラーゲンやヒアルロン酸が分解されその量が減少すると、皮膚の潤い、ハリがなくなり、皮膚の老化現象であるシワやたるみが起こるといわれている。

る。

そこで、皮膚外用剤や各種化粧品に、皮膚の老化防止やしわ防止作用等を期待してこれら酵素の活性を阻害する物質等を配合することが提案され、従来、様々なコラゲナーゼ活性阻害剤やヒアルロニダーゼ活性阻害剤が開発されている。

【0003】

ところで、アセロラの果実は、豊富なビタミンCを含む植物として近年知られるようになり、現在では世界各国で飲料や健康食品として用いられている。また、豊富なビタミンCを含むアセロラの果実は、その抽出物に含まれるビタミンCによる抗酸化作用等を期待して化粧品等に用いられるようになっている(例えば、特許文献1～4参照)。

しかし、アセロラの果実において化粧品や食料品に利用されているのは、ビタミンCを多く含む果肉のみであり、その種子は、有効利用の途がほとんど見出されておらず、大部分が廃棄されているのが現状である。最近、アセロラ種子を含む植物の種子を水蒸気蒸留法により処理して得られる水蒸気蒸留水を、皮膚感触改善効果を期待して化粧品に配合した組成物が提案されている(例えば、特許文献5参照)が、更なる有効利用の途が望まれている。

また、このようなアセロラの種子は、その含有成分、及びその作用等についてもほとんど知られていない。

【0004】

【特許文献1】

特許第2814094号明細書

【特許文献2】

特開2000-212026号公報

【特許文献3】

特開2000-212027号公報

【特許文献4】

特開2000-212032号公報

【特許文献5】

特開2001-226218号公報

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

従って本発明の目的は、従来、そのほとんどが廃棄処理されていたアセロラ種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、化粧品や食料品等に利用して優れた抗酸化作用を示す抗酸化剤を提供することにある。

本発明の別の目的は、従来、そのほとんどが廃棄処理されていたアセロラ種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、皮膚外用剤や各種化粧品等に利用して優れたコラゲナーゼ活性阻害作用やヒアルロニダーゼ活性阻害作用を示すコラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤を提供することにある。

本発明の他の目的は、安定した抗酸化作用、コラゲナーゼ活性阻害作用やヒアルロニダーゼ活性阻害作用を期待しうる安全性に優れ、皮膚の老化防止やしわ防止作用が期待しうる皮膚外用剤及び化粧料を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、安定した抗酸化作用を期待しうる安全性に優れた食料品を提供することにある。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、従来、果汁の圧搾後、廃棄されていたアセロラ種子の有用性について鋭意検討した。その結果、アセロラ種子から得られる抽出物が、強力な抗酸化能、コラゲナーゼ活性阻害能及びヒアルロニダーゼ活性阻害能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明によれば、アセロラ種子の抽出物を有効成分として含む抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤が提供される。

また本発明によれば、前記抗酸化剤、前記コラゲナーゼ活性阻害剤、前記ヒアルロニダーゼ活性阻害剤の少なくとも1種を含むことを特徴とする皮膚外用剤又は化粧料が提供される。

更に本発明によれば、前記抗酸化剤を含むことを特徴とする食料品が提供される。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】



以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤及びヒアルロニダーゼ活性阻害剤は、アセロラ種子の抽出物を有効成分として含む。

アセロラ種子は、大西洋のカリブ海西インド諸島を原産とするアセロラ (*Acerola*、学名: *Malpighia emarginata* DC) の種子である。

アセロラの果肉はビタミンCが豊富であることが知られ、食料品、化粧品等に利用されているが、その種子は、その有効利用の途がほとんど見出されていない。

#### 【0008】

アセロラ種子の抽出物は、例えば、抽出溶媒を用いて抽出したものであれば特に限定されず、リノール酸自動酸化抑制能やDPPHラジカル消去作用等の抗酸化機能を有しておれば、その抽出方法や条件は特に限定されない。また、アセロラ種子の生産地及び品種についても何ら制限されず、例えば、生産地としては、沖縄、ブラジルが挙げられる。

#### 【0009】

アセロラ種子の抽出物とは、例えば、生のアセロラ種子、その乾燥物、或いは凍結物を、粉碎等して加工し、水及び／又は有機溶媒を加えて抽出した抽出物、得られた抽出物を濃縮した濃縮物、また、前記抽出物や濃縮物を更に液液抽出やカラムクロマトグラフィー等で分画精製した分画精製物、これらの乾固物の総称を意味し、その形態は液状、ペースト状、固体のいずれも含む意である。

#### 【0010】

前記抽出物を得るために用いる有機溶媒は、親水性有機溶媒、疎水性有機溶媒のいずれでもよい。親水性有機溶媒としては、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等のアルコール；アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、ピリジン、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸等の公知の有機溶媒が挙げられる。疎水性有機溶媒としては、例えば、ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙

げられる。これらの有機溶媒は使用に際しては1種又は2種以上を組み合わせで用いることができる。中でも、水及び／又は親水性有機溶媒、特に、メタノール、エタノール、1,3-ブチレングリコール、水又はこれらの混合物や組合せが好ましい。

#### 【0011】

抽出条件は特に限定されないが、例えば、温度は5～95℃、好ましくは10～90℃、更に好ましくは15～85℃で、常温でも好適に抽出できる。温度が高い方が、抽出効率が高くなる傾向がある。抽出時間は、数時間～数日間であり、また、抽出に使用する溶媒量は、原料に対して質量比で通常1～20倍量、好ましくは2～10倍量である。

抽出操作も特に限定的ではなく、常法に従って行えばよい。抽出効率を向上させるため、振とう抽出や、攪拌機等を備えた抽出機を用いても抽出することができる。例えば、アセロラ種子を抽出溶媒に浸漬するか、若しくは浸漬せずに、抽出溶媒と共に攪拌、振とうする抽出処理を行い、処理液を、濾過、遠心分離又はデカンテーション等によって抽出液と抽出残渣に分離することにより抽出処理を行うことができ、抽出残渣は更に同様な抽出処理に付しても良い。得られる抽出液はそのまま用いても良いが、必要により、更に濃縮処理及び／又は分画・精製処理することもできる。

#### 【0012】

前記濃縮処理は特に限定されず、例えば、溶媒除去、水及び／又は有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理、不溶分回収処理、水-疎水性有機溶媒での液液分配処理、再結晶処理、再沈澱処理、冷却により生じた析出物を回収する処理等、若しくはこれらから選択される2種以上の処理を組合せる方法等が挙げられる。

前記分画・精製処理も特に限定されず、例えば、順相及び／又は逆相クロマトグラフィーによる処理等が挙げられる。

#### 【0013】

本発明の抗酸化剤の有効成分としてのアセロラ種子の抽出物は、ケルシトリンを含むことが好ましい。また、本発明のコラゲナーゼ活性阻害剤及びヒアルロ

ニダーゼ活性阻害剤の有効成分としてのアセロラ種子の抽出物が、クエルシトリンを含んでいても良い。

本発明の抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤において、有効成分であるアセロラ種子の抽出物の使用量は、使用形態等により適宜選択することができる。

#### 【0014】

本発明の皮膚外用剤及び化粧品は、前記本発明の抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤の少なくとも1種を含んでおれば良い。また、前記化粧料の種類は特に限定されず、例えば、化粧水、乳液、クリーム、パック、洗浄料等のスキンケア化粧料；口紅、ファンデーション等のメーキャップ化粧料；頭髮用化粧料等が挙げられ、その剤型は特に制限されず任意である。また、皮膚外用剤としては、軟膏、各種皮膚用薬剤等が挙げられる。

本発明の皮膚外用剤及び化粧品において、本発明の抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤の配合割合は、その種類及び配合される他の成分の種類や量、形態等に応じて適宜選択できるが、通常、皮膚外用剤又は化粧品全量に対して、アセロラ種子抽出物の乾燥物換算で0.001～20質量%、好ましくは0.01～10質量%である。

#### 【0015】

本発明の皮膚外用剤又は化粧品には、本発明の所望の効果を損なわない範囲で、通常、皮膚外用剤原料や化粧品原料として用いられる種々の他の成分を配合することができる。他の成分としては、例えば、水、油剤、界面活性剤、潤滑剤、アルコール類、水溶性高分子剤、ゲル化剤、保湿剤、緩衝剤、防腐剤、抗炎症剤、増粘剤、香料、ビタミン類、本発明の抗酸化剤以外の抗酸化剤等が挙げられ、使用に際しては、これらから1種又は2種以上を適宜選択して配合することができる。

#### 【0016】

本発明の食料品は、前記本発明の抗酸化剤を含んでおれば良く、食料品の種類は特に限定されず、例えば、飴、飲料、ジャム、チューインガム等が挙げられる。また、その剤型は特に制限されず任意である。

本発明の食料品において、本発明の抗酸化剤の配合割合は、食料品の種類及び該食料品に配合される他の成分の種類や量、形態等に応じて適宜選択できるが、通常、食料品全量に対して、アセロラ種子抽出物の乾燥物換算で0.001~20質量%、好ましくは0.01~10質量%である。

#### 【0017】

本発明の食料品には、本発明の所望の効果を損なわない範囲で、通常、食料品原料として用いられる種々の他の成分を配合することができる。他の成分としては、例えば、水、アルコール類、甘味料、酸味料、着色料、保存料、香料、賦形剤等が挙げられ、使用に際しては、これらから適宜選択して1種又は2種以上を配合することができる。

#### 【0018】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

##### 実施例1

洗浄したアセロラ種子を乾燥後、破碎して得られた粉碎物6140gに7倍質量のメタノールを加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、ろ過し、ろ液を濃縮乾固して抽出物(A)を225.89g得た。

この抽出物(A)に水2000mlを加え、更にヘキサン1200mlを加えて振とうした後、分液された水層を回収した。この水層に対し、ヘキサンを用いた同様の振とうを更に2回繰り返した。ヘキサン層を除いて得られた水層に、酢酸エチル1200 mlを加えて振とうすることを10回繰り返し、分液された酢酸エチル層を集めて濃縮乾固し、濃縮物(A)を11.48g得た。次に、濃縮物(A)を、シリカゲル(ワコーシルC-300:和光純薬社製)を充填したカラムを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。クロロホルム、クロロホルム:メタノール(97:3、9:1、8:2、6:4、4:6、2:8)、メタノールで順次溶出させた。クロロホルム溶出部を15の画分に分け(画分1~15)、その後のクロロホルム:メタノール溶出部をそれぞれ、画分16(97:3)、17(9:1)、18(8:2)、19(6:4)、20(4:6)とした。

#### 【0019】

各画分の抗酸化活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いた評価法により確認した。すなわち、各画分の試料をシリカゲル薄層プレートに塗付し、展開溶媒により展開した。この際、蛍光指示薬を含有するプレートを用い(K5F Silica Gel 150 Å : Whatman社製)、展開後、乾燥したプレートに紫外線を照射することで、UV吸収をもつ試料のスポットを検出した。その後、プレートに安定なラジカルであるDiphenyl-p-picrylhydrazyl (DPPH)の $6 \times 10^{-4}$ Mメタノール溶液を噴霧した。DPPH溶液は紫色を呈しているが、ラジカルが消去されるとその色を失う。このため、ラジカル消去活性をもつ物質のスポット部分では、DPPHラジカルが消去されることでスポット部分が白く抜けて見える。

画分1~20をシリカゲルプレートに塗付し、クロロホルム：メタノール=9：1の溶媒でプレート先端まで展開した後、DPPH溶液を噴霧した。結果を図1に示す。図1より、アセロラ種子抽出物には、抗酸化活性を有する多数の物質が含まれていることがわかる。

#### 【0020】

このうち、画分19を、逆相系高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により更に精製した。まず下記溶出条件で粗精製し、更に以下の条件を行うことで精製した。HPLC条件を以下に示す。

カラム：Hydrosphere C-18[20×250mm](YMC)、流速：5ml/分、温度：35℃  
検出：UV at 254nm、Eluent：30%メタノール(0-2min)、30-100%メタノール(2-32min、linear)、100%メタノール(32-40min)、30%メタノール(40-50min)の条件で粗精製した後、アセトニトリル/水(30/70)で最終精製を行って、分画精製物72mgを得た。

得られた分画精製物に対し、各種スペクトル測定を行った。得られたデータを以下に示す。

マススペクトル：[M-H]<sup>-</sup> 447

紫外線吸収スペクトル：(EtOH) 256.5nm、352.00nm、H-NMRケミカルシフト：500 MHz 溶媒CD<sub>3</sub>OD、0.94ppm(d:J=6.1Hz)、6.91ppm(d:J=8.2Hz)、7.31ppm(d, d:J=8.2, 2.1Hz)、7.34 ppm(d:J=2.1Hz)、6.20ppm(d:J=2.1Hz)、6.37ppm(d:J=2.1 Hz)、3.33ppm(m:J= 9.5, 9.3Hz)、3.41ppm(m:J= 9.5Hz)、3.74ppm(d, d:J=9.3, 3.3 Hz)

、4.21ppm(d, d: J= 3.3Hz)、5.35ppm(d: J=1.7Hz)、C-NMR ケミカルシフト: 125.8 MHz 溶媒 CD<sub>3</sub>OD、17.7ppm、72.0ppm、72.1ppm、72.2ppm、73.3ppm、94.8ppm、99.9ppm、103.6ppm、106.0ppm、116.4ppm、117.0ppm、122.9ppm、123.1ppm、136.3ppm、146.5ppm、149.9ppm、158.6ppm、159.4ppm、163.3ppm、166.0ppm、179.7ppm。

マスペクトルにおいて、脱プロトン化分子と考えられるイオンが  $m/z$  447 に観測され、分子量は 448 と考えられた。H-NMR では、0.94ppm は CH<sub>3</sub>、6.91ppm、7.31ppm、7.34ppm は 1,2,4-置換ベンゼン、6.20ppm、6.37ppm は 1,2,3,5-置換ベンゼンの <sup>1</sup>H に帰属された。3.33~5.35ppm には 5 種類のピークが観測された。また、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルでは 21 本のピークが観測され、70-74ppm の 4 本のピークは >CH-O- と考えられ、179.7ppm には共役カルボニルに帰属できるピークが観測された。これらデータよりケルセチン配糖体の可能性が示唆されたため、更に高分解能マスペクトルの測定及び、ケルセチン配糖体で分子量 448 であるケルシトリン標品の NMR スペクトルとの比較を行った。高分解能マスペクトル測定を行った結果、精密質量 447.0917 が得られ、C、H、O を元素種として組成計算を行った。その結果、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルで観測された炭素数 21 を満足する組成式 C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>11</sub> が算出され、分子式は C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>11</sub> と決定された。更に NMR スペクトルを、ケルシトリン(ケルセチン-3-ラムノシド)標品のスペクトルと比較した結果、一致したため、アセロラ種子の抽出物より分離精製された物質はケルシトリンであると同定した。

#### 【0021】

ケルシトリンは、フラボノイドの一つで自然界に広く分布しており、特にドクダミに豊富に含まれることが知られている。以上の結果から、アセロラ種子にケルシトリンが含まれ、該ケルシトリンが抽出物中の抗酸化活性に関与する物質の一つであることが判った。

#### 【0022】

##### 実施例2

洗浄したアセロラ種子 100g を破碎し、3 倍体積の水を加え、室温で一晩振とうした。全量をガラスフィルター、0.65  $\mu$ m フィルター及び 0.22  $\mu$ m フィルターでろ

過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物1gを得た。

次に、リノール酸を用いた抗酸化活性測定(ロダン鉄法)により得られた抽出物の抗酸化活性を測定した。

即ち、2.5% (w/v) リノール酸(99.5%エタノール溶液)2ml及び0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)4mlの反応液に、アセロラ種子の抽出物0.4mg、99.5%エタノール2ml及び蒸留水2mlからなる混液を混合し、褐色ネジ口瓶に入れ10mlの試験液を調製した。また、アセロラ種子抽出物の代わりに $\alpha$ -トコフェロール又はBHAを用い、反応液中にアセロラ種子の抽出物と同量含まれるように同様の操作を行い、各々試験液を調製し、これらを正の対照とした。コントロールにはアセロラ種子抽出物を添加せず、99.5%エタノール2ml及び蒸留水2mlのみを反応液に添加した試験液を用いた。得られた各試験液を暗所にて40℃で保存したものを本検、4℃で保存したものを盲検として、経時的に被検物を取り出し以下の方法により測定を行った。試験は14日間行った。

#### 【0023】

まず、被検物0.1ml、75%エタノール9.7ml、30%ロダンアンモニウム水溶液0.1mlの混液に、 $2 \times 10^{-2}M$ の塩化第一鉄(3.5%塩酸溶液)0.1mlを加えてから正確に3分後500nmにおける吸光度を測定した。盲検についても同様に測定し、 $\Delta$ 吸光度=(本検の吸光度)-(盲検の吸光度)とした。試料の酸化が始まると吸光度は上昇し、最高点に達した後、酸化されるべき試料が少なくなるにつれて吸光度は減少する。従って、吸光度のピークが早くできはじめるほど抗酸化活性は弱いといえる。また、酸化率を用いて各試験液の抗酸化活性を比較した。酸化率は、コントロールの酸化(吸光度)を100%として、以下の式で求めた。酸化率が高いほど抗酸化活性が低いことを意味する。

$$\text{酸化率(\%)} = ([\text{試料の}\Delta\text{吸光度}] / [\text{コントロールの}\Delta\text{吸光度}]) \times 100$$

吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

#### 【0024】

##### 実施例3

洗浄したアセロラ種子100gを破碎し、3倍体積の、エタノール含量が25体積%

の含水エタノール水溶液を加え、室温で一晩振とうした。全量を実施例2と同様なフィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物を1.69g得た。

得られた抽出物を用いて実施例2と同様に抗酸化活性を測定した。吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

#### 【0025】

##### 実施例4

洗浄したアセロラ種子100gを破碎し、3倍体積の、エタノール含量が50体積%の含水エタノール水溶液を加え、室温で一晩振とうした。全量を実施例2と同様なフィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物2.27gを得た。

得られた抽出物を用いて実施例2と同様に抗酸化活性を測定した。吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

#### 【0026】

##### 実施例5

洗浄したアセロラ種子100gを破碎し、3倍体積の、エタノール含量が75体積%の含水エタノール水溶液を加え、室温で一晩振とうした。全量を実施例2と同様なフィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物2.50gを得た。

得られた抽出物を用いて実施例2と同様に抗酸化活性を測定した。吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

図2及び3より、アセロラ種子の抽出物には明らかにリノール酸の酸化抑制効果があり、またその強さは代表的抗酸化剤である $\alpha$ -トコフェロール、BHAと比較して、同等又は同等以上であることが判った。更に、実施例2～5の結果より、抽出溶媒として用いる含水エタノール中のエタノールの割合を変化させることで、抗酸化活性の強さをコントロールできることが判る。

#### 【0027】

##### 実施例6

洗浄したアセロラ種子760gを破碎し、5倍質量のメタノールを加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、ろ過し、ろ液を濃縮乾固して抽出物12.36g得た。この抽出物に水300mlを加え、更にヘキサン100mlを加えて振とうした後、分液された水層を回収した。この水層に対し、ヘキサンをを用いた同様の振とうを更に3回



繰り返した。ヘキサン層を除いて得られた水層に、酢酸エチル100mlを加えて振とうすることを6回繰り返し、分液された酢酸エチル層を集めて濃縮乾固し、固形分0.41gを得た。

得られたアセロラ種子の抽出物の抗酸化活性を実施例2と同様にロダン鉄法により測定した。この際、試験期間は20日間とした。試験開始後20日目の各試料溶液の酸化率を図4に示す。

図4より、アセロラ種子の抽出物の酢酸エチル画分には、抽出物そのものと同様に明らかにリノール酸の酸化抑制効果があり、またその強さは、 $\alpha$ -トコフェロールよりも強いことが判った。

#### 【0028】

##### 実施例7

洗浄したアセロラ種子70gを破碎し、4倍質量の、1,3-ブチレングリコール含量が30質量%の1,3-ブチレングリコール水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、上清を0.22 $\mu$ mフィルターでろ過し、アセロラ種子の抽出物を溶液として124.12g得た。

得られたアセロラ種子の抽出物の抗酸化活性を以下のDPPHラジカル消去による方法により測定した。結果を表1に示す。

250mM酢酸緩衝液(pH=5.5)1600 $\mu$ lにエタノール1200 $\mu$ l、検体400 $\mu$ l(任意の濃度に調整)を混合し、30℃、5分間プレインキュベートした。この液に500 $\mu$ M DPPH/エタノール溶液を800 $\mu$ l添加混合し、30℃、30分間放置後、517nmの吸光度を測定した。 $\alpha$ -トコフェロールについても同様の操作を行い、これを正の対照とした。コントロールには、試料溶液の代わりにその溶媒を用いて同様の操作を行ったものを用いた。測定された吸光度から、次式によりラジカル消去率を算出した。

$$\text{消去率(\%)} = (1 - [\text{試料の吸光度}] / [\text{コントロールの吸光度}]) \times 100$$

試料溶液の試料濃度を段階的に変更して上記消去率の測定を行い、DPPHラジカルの消去率が50%になる試料溶液の濃度を求め、DPPHラジカル50%消去濃度とした。よって、この数値が低いほどラジカル消去能が高いことを意味する。

#### 【0029】

【表1】

測定試料	DPPH ラジカル 50%消去濃度( $\mu$ g/ml)
実施例7の抽出物	115.24
$\alpha$ -トコフェロール	110.13

表1より、実施例7の抽出物は $\alpha$ -トコフェロールと同等のラジカル消去能を有することが判った。

## 【0030】

## 実施例8

洗浄したアセロラ種子1500gを破碎し、2倍質量の、1,3-ブチレングリコール含量が30質量%の1,3-ブチレングリコール水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、上清を0.22 $\mu$ mフィルターでろ過し、アセロラ種子抽出物を溶液として2327g得た。

得られたアセロラ種子抽出物の抗酸化活性を、実施例2と同様にロダン鉄法により測定した。但し、アセロラ種子抽出物は溶液であることから、水とエタノールを用いて必要濃度に希釈して添加し、アセロラ種子抽出液のコントロールには、添加したアセロラ種子抽出液と同様の溶媒組成でアセロラ種子抽出物を含まないものを用いた。また、試験期間は7日とした。

吸光度の経時的変化の結果を図5に、試験開始後7日目の各試料溶液の酸化率を図6に示す。

図5及び6より、アセロラ種子抽出物には明らかにリノール酸の酸化抑制効果があり、またその強さは、 $\alpha$ -トコフェロール、BHAと比較して、同等又は同等以上であることが判った。

## 【0031】

ところで、従来よりビタミンCが抗酸化作用を有することが知られているので、上記で調製したアセロラ種子抽出液中のビタミンC量を測定し、上記アセロラ種子抽出液における抗酸化作用が含有されるビタミンCのみによるものか否かを検討した。

まず、上記で調製したアセロラ種子抽出液100g中に含有されるビタミンC量を

測定したところ、57mg/100g(酸化型ビタミンC: 56mg/100g+還元型ビタミンC: 1mg/100g)であった。そこで、上記で調製したアセロラ種子抽出液100gを蒸発乾固したところ、固形分975mgが得られた。次いで、実施例2と同様にロダン鉄法により抗酸化活性を測定した。この際、本実施例のアセロラ種子抽出物は溶液であることから、上記と同様、反応液中に固形分として0.4mg含まれるように希釈して添加した。またコントロールにも上記と同様、添加したアセロラ種子抽出液と同様の溶媒組成でアセロラ種子抽出物を含まないものを用いた。なお、測定は7日間で行った。対照として、該固形分0.4mg中に含まれるビタミンC 0.023mg ( $0.4\text{mg} \times (57\text{mg}/975\text{mg})$ )を用いて同様に抗酸化活性を測定した。

試験開始後7日目の酸化率は、アセロラ種子抽出物が1.9%であったのに対して、ビタミンC単独のものは115.8%であった。

以上の結果より、アセロラ種子抽出物中に含まれるビタミンCは、該抽出物の抗酸化作用にはほとんど寄与していないことが判った。

#### 【0032】

更に、本発明におけるアセロラ種子抽出物において、実施例1で確認した抗酸化作用を示す物質の1つであるケルシトリンについて、上記で調製したアセロラ種子抽出物中に含有されるか否かを実施例1と同様に測定した。その結果、ケルシトリンを含有していることが判った。

ところで、従来、例えば、特開平7-300581号公報において、ケルシトリンが抗酸化作用を有することが提案されている。そこで、上記アセロラ種子抽出液における抗酸化作用が含有されるケルシトリンのみによるものか否かを以下の方法で検討した。

まず、ケルシトリンはポリフェノールの1種であるので、上記で調製したアセロラ種子抽出液中のポリフェノール量をFolin-Denis法により測定したところ、抽出液100g中の固形分975mgに占めるポリフェノールの割合は25%であった。従って、上記で調製したアセロラ種子抽出液の固形分中に含まれるケルシトリン量は、最大でも25%である。この結果に基づいて、上記ビタミンCとの比較試験と同様に、実施例2と同様にロダン鉄法により抗酸化活性を測定した。この際、測定は7日間で行った。対照として、該固形分0.4mg中にケルシトリンが32%

(最大量でも25%であるので、それ以上の量)含まれると仮定した場合のケルシトリン0.128mgを用いて同様に抗酸化活性を測定した。

その結果、試験開始後7日目の酸化率は、アセロラ種子抽出物が1.9%であったのに対して、ケルシトリン単独のものは6.9%であった。

以上の結果より、アセロラ種子抽出物中に含まれるケルシトリンは、該抽出物の抗酸化作用の有効成分の1つではあるが、該抽出物の抗酸化作用はケルシトリンのみの作用ではなく、しかも、アセロラ種子抽出物は、ケルシトリン単独による抗酸化作用よりも優れていることが判った。

#### 【0033】

##### 実施例9

実施例2～5で調製した各アセロラ種子抽出物について、以下の方法によりコラゲナーゼ活性阻害作用を測定した。

##### 測定方法

##### 〔試薬の調製〕

基質溶液：Pz-ペプチド(BACHEM社製)0.39mgを、0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.1、含20mM塩化カルシウム)1mlに溶解して使用した(0.5Mに相当)。

酵素溶液：コラゲナーゼ(TYPE IV、シグマ社製)5mgを蒸留水1mlに溶解させ100 $\mu$ lずつ分注し、-20℃で保管する。使用時に蒸留水で50倍に希釈して反応に用いた。

#### 【0034】

##### 〔コラゲナーゼ活性阻害作用測定法〕

実施例2の抽出物は15mg/ml、実施例3、4、5の抽出物は0.5mg/mlの濃度となるように、それぞれの抽出溶媒で溶解して調製を行い、これらを試料溶液とした。これらの試料溶液50 $\mu$ l、コラゲナーゼ溶液50 $\mu$ l及び基質溶液400 $\mu$ lを混合し、37℃で30分間インキュベーションした。次いで、25mMクエン酸溶液1mlで反応を停止し、酢酸エチル5mlで抽出した。遠心分離(3000rpm、10分間)後、酢酸エチルを対照として、酢酸エチル層の波長320nmにおける吸光度を測定した。対照には、試料溶液の代わりに各抽出溶媒を用い、また、それぞれのブランクとして、酵素溶液の代わりに蒸留水を加えて同様の操作を行った。

これらの値からコラゲナーゼ活性阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = [1 - (A - B) / (C - D)] \times 100$$

但し、A：試料溶液の320nmにおける吸光度、B：試料溶液ブランクの320nmにおける吸光度、C：対照溶液の320nmにおける吸光度、D：対照溶液ブランクの320nmにおける吸光度である。

上記方法で実施例2～5の抽出物のコラゲナーゼ活性阻害率を求めた。結果を表2に示す。

【0035】

【表2】

試料	濃度 (mg/ml)	コラゲナーゼ 活性阻害率(%)
実施例 2	15	35.9
実施例 3	0.5	78.0
実施例 4	0.5	76.6
実施例 5	0.5	78.9

【0036】

#### 実施例10

実施例8で調製したアセロラ種子抽出物について、実施例9と同様の方法によりコラゲナーゼ活性阻害作用を測定した。但し、実施例8の抽出物は溶液であることから、アセロラ種子抽出物が固形物として0.5mg/mlの濃度となるように抽出溶媒である30質量%1,3-ブチレングリコール水溶液で希釈したものを試料溶液とした。このようにして実施例8の抽出物のコラゲナーゼ活性阻害率を求めた結果、71.5%であった。

【0037】

#### 実施例11

実施例8で調製した抽出物のヒアルロニダーゼ活性阻害作用を測定した。ヒアルロニダーゼ活性阻害測定は、Morgan-Elson法を応用した前田有美恵らの方法(食衛誌、31巻、233-237、1990年)にて行った。

#### 測定方法

〔試薬の調製〕

酵素溶液：牛精巢ヒアルロニダーゼ(和光純薬工業(株)製)を0.1M酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終酵素活性を400ユニット/mlに調整した。

酵素活性化溶液：compound 48/80 (シグマ社製) を0.1M酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終濃度を0.1mg/mlに調整した。

基質溶液：ヒアルロン酸カリウム(和光純薬工業(株)製)を0.1M酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終濃度を0.4mg/mlに調整した。

ホウ酸溶液：ホウ酸4.95gに水50mlを加え、1N水酸化ナトリウム溶液でpH=9.1にし、水を加えて100mlに調整した。

p-ジメチルアミノベンズアルデヒド(p-DAB)試薬：10N塩酸12.5mlと酢酸87.5mlの混液にp-DAB(和光純薬工業(株)製)を10g溶解し冷蔵保存する。使用直前に酢酸で10倍希釈して用いた。

#### 【0038】

##### 〔ヒアルロニダーゼ活性阻害作用測定法〕

実施例8の抽出物は溶液であることから、アセロラ種子抽出物が固形物として1mg/mlの濃度となるように抽出溶媒である30質量%1,3-ブチレングリコール水溶液で希釈したものを試料溶液とした。この試料溶液0.2mlに酵素溶液0.1mlを加えて、37℃で20分間放置した。次に、酵素活性化溶液0.2mlを加えて37℃で20分間加温し、さらに基質溶液0.5mlを加えて37℃で40分間反応させた後、0.4Nの水酸化ナトリウム水溶液を0.2ml加えるとともに氷冷して反応を停止させた。ホウ酸溶液0.2mlを加えてホットブロックバス(TOYO SEISAKUSHO、MODEL TPB-32)により100～120℃で5分間加熱後氷冷し、p-DAB試薬6mlを加えて37℃で20分間加温して発色させ、585nmにおける吸光度を蒸留水を対照として測定した。対照には、試料溶液の代わりに抽出溶媒を用い、またそれぞれのブランクとして、酵素溶液の代わりに0.1M酢酸緩衝液(pH=4.0)を加えて同様の操作を行った。

これらの値からヒアルロニダーゼ活性阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = [1 - (A - B) / (C - D)] \times 100$$

但し、A：試料溶液の585nmにおける吸光度、B：試料溶液ブランクの585nmにおける吸光度、C：対照溶液の585nmにおける吸光度、D：対照溶液ブランクの585nmにおける吸光度である。

上記方法で実施例8の抽出物のヒアルロニダーゼ活性阻害率を求めた結果、94.5%であった。

【0039】

#### 実施例12

平成9年3月26日付厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」に従ってアセロラ種子抽出物の安全性試験を行なった。アセロラ種子抽出物としては、実施例8で調製したアセロラ種子抽出物を用いた。結果を表3に示す。

#### ラットを用いる単回経口投与毒性試験

ラット2群(対照群、投与群)に対して、雌雄各5匹/群にて試験を行い、投与群には体重あたり2g/kg投与した。

#### モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験

モルモット3匹の健常皮膚に24時間閉塞貼付を行い、除去後24時間、48時間及び72時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

#### モルモットを用いる14日間皮膚累積刺激性試験

モルモット3匹の健常皮膚に、14日間連続の開放系で1日1回塗布を行い、試験期間中の毎日、塗布前及び塗布後24時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

#### モルモットを用いる皮膚感作性試験

モルモット3群(対照群、塗布群、DNCB群)に対して、5匹/群にてAdjuvant and Patch Test法に準じて試験を行い、塗布後24時間及び48時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

#### モルモットを用いる皮膚光毒性試験

モルモット10匹の背部皮膚に森川藤鳳らの方法に準じて試験を行い、紫外線照射後24時間、48時間及び72時間にそれぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

【0040】

#### モルモットを用いる皮膚光感作性試験

モルモット3群(対照群、投与群、TCSA群)に対して、5匹/群にてAjuvant and Strip法に準じて試験を行い、紫外線照射後24時間及び48時間に、それぞれ皮膚

の状態を観察して判定を行った。

#### ウサギを用いる眼粘膜刺激性試験

ウサギ2群(非洗眼群、洗眼群)に対して、3匹/群にて試験を行った。点眼後、非洗眼群はそのままにし、洗眼群は微温の生理食塩水で約1分間洗浄し、その後1時間、24時間、48時間及び72時間後に、角膜、虹彩及び結膜の状態について観察し、AFNORの区分から判定を行った。

#### 細菌を用いる復帰突然変異試験

プレインキュベーション法により、S9mix無添加とS9mix添加の場合について測定を行った。

- ・使用菌株: Salmonella typhimurium TA100、TA98、TA1535、TA1537
- ・使用菌株: Escherichia coli WP2uvrA

#### 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

哺乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用いて3群(陰性対照群、被検物質群、陽性対照群)に対して、短時間処理法(6時間処理: S9mix無添加及びS9mix添加)及び連続処理法(24時間及び48時間処理)で検討を行った。

【0041】

【表3】

安全性試験項目	結果
1)ラットを用いる単回経口投与毒性試験	毒性なし
2)モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験	刺激性なし
3)モルモットを用いる14日間皮膚累積刺激性試験	刺激性なし
4)モルモットを用いる皮膚感作性試験	感作性なし
5)モルモットを用いる皮膚光毒性試験	光毒性なし
6)モルモットを用いる皮膚光感作性試験	光感作性なし
7)ウサギを用いる眼粘膜刺激性試験	眼刺激性なし
8)細菌を用いる復帰突然変異試験	変異原性なし
9)哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験	異常なし

【0042】

#### 処方例1



グリチルリチン酸ジカリウム0.20質量部、クエン酸0.10質量部、クエン酸ナトリウム0.30質量部、実施例7で調製したアセロラ種子の抽出物5.00質量部及び1,3-ブチレングリコール5.00質量部を混合して、精製水を加えて全体量を80.0質量部にして50℃で攪拌しながら溶解して抽出物含有水溶液を調製した。

次いで、テトラオレイン酸POE(60)ソルビトール0.90質量部、モノオレイン酸ソルビタン0.10質量部、適量の防腐剤及びエタノール10.00質量部を混合して、50℃で攪拌しながら溶解した。続いて、得られた溶液を、最初に調製した抽出物含有水溶液に少量ずつ加えて、50℃で混和攪拌した。均一に混和したら、更に攪拌しながら50℃から30℃に液温を下げ、30℃になったらところで攪拌を止め、適量の香料及び精製水を加えて全体量を100.00質量部にした。再度、混和攪拌し、均一に混和させて化粧水を調製した。

#### 【0043】

##### 処方例2

スクワレン10.00質量部及び適量の防腐剤を混合し、精製水を加えて全体量を70.00質量部に調整し、80℃に加温して溶液(1)を調製した。また、カルボキシビニルポリマー0.10質量部及びキサントガム0.20質量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(2)を調製した。更に、トリエタノールアミン0.10質量部及び1,3-ブチレングリコール5.00質量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(3)を調製した。更にまた、ヒアルロン酸ナトリウム2.00質量部及び実施例8で調製したアセロラ種子の抽出物5.00質量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(4)を調製した。

次いで、適量の精製水に溶液(1)を少量ずつ加え、80℃で混和攪拌し、更に攪拌しながら、溶液(2)を加え、続いて溶液(3)を加えた。均一に混和したら、攪拌しながら溶液を50℃に下げて、50℃になったところで、溶液(4)を加え、更に精製水を加えて全体量を100質量部に調整した。溶液が30℃になるまで再度攪拌し、30℃になったらところで攪拌を止め、均一に混和された乳液を調製した。

#### 【0044】

##### 処方例3

POE(20)ソルビタンモノステアレート2.00質量部、POEソルビタンテトラオレエ

ート0.50質量部、モノステアリン酸グリセリル0.50質量部、ステアリン酸7.00質量部、セチルアルコール3.00質量部、パルミチン酸セチル3.00質量部、ホホバ油7.00質量部、パラフィン3.00質量部及び適量の防腐剤を混合して、80℃で攪拌しながら溶解し溶液(1)を調製した。一方、実施例8で調製したアセロラ種子の抽出物5.00質量部、1,3-ブチレングリコール7.00質量部及び精製水62質量部を混合して、80℃で攪拌しながら溶解し溶液(2)を調製した。

次いで、溶液(2)に溶液(1)を少量ずつ加え、乳化し、攪拌しながら冷却して40℃に降温したところで攪拌を止め、均一に混和されたクリームを調製した。

#### 【0045】

##### 処方例4

濃縮グレープフルーツジュース100g、糖類150g、はちみつ15g、実施例2と同様の条件で調製したアセロラ種子の抽出物(A)1.5g及び適量の香料に、全体量が1000gとなるように精製水を混合した。次いで、95℃で20分間殺菌し、100mlずつ無菌的にビンに充填してグレープフルーツジュースを製造した。

#### 【0046】

##### 【発明の効果】

本発明の抗酸化剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤及びコラゲナーゼ活性阻害剤は、アセロラ種子の抽出物を有効成分とし、安全性に優れ、且つ強力な抗酸化活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性又はコラゲナーゼ阻害活性を有する。本発明の皮膚外用剤、化粧料及び食料品は、本発明の抗酸化剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤又はコラゲナーゼ活性阻害剤を含むので、抗老化作用、しわ防止作用、活性酸素に起因する食料品の品質保持や酸化防止作用が得られる。加えて、産業廃棄物であったアセロラ種子の有効な利用も可能となる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

実施例1で調製したアセロラ種子抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画した各画分の抗酸化活性を薄層クロマトグラフィーを用いて測定した結果を示す写真の写しである。

##### 【図2】

実施例2～5で調製したアセロラ種子抽出物の酸化率測定のための吸光度の経時的変化を示すグラフである。

【図3】

実施例2～5で調製したアセロラ種子抽出物の14日目の酸化率を示すグラフである。

【図4】

実施例6で調製したアセロラ種子抽出物の20日目の酸化率を示すグラフである。

【図5】

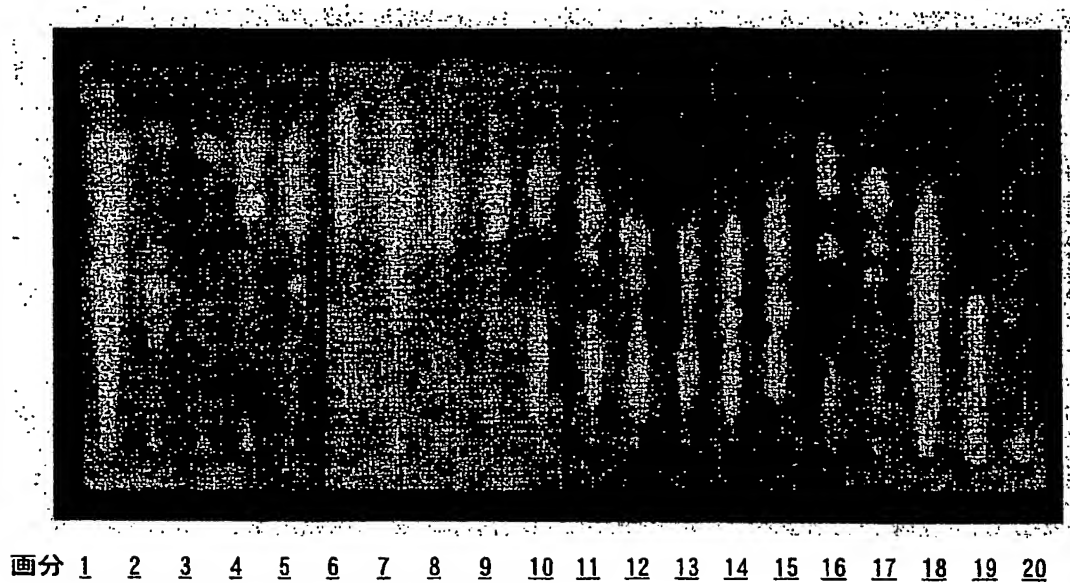
実施例8で調製したアセロラ種子抽出物の酸化率測定のための吸光度の経時的変化を示すグラフである。

【図6】

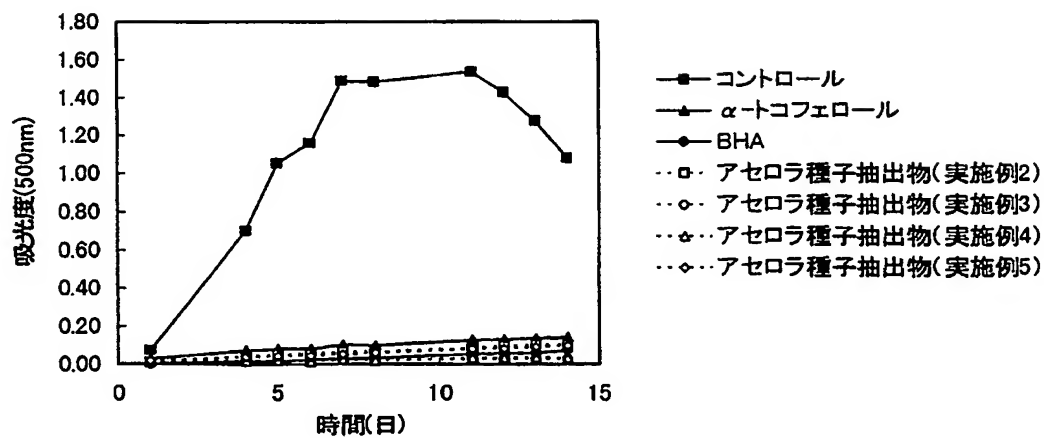
実施例8で調製したアセロラ種子抽出物の7日目の酸化率を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】

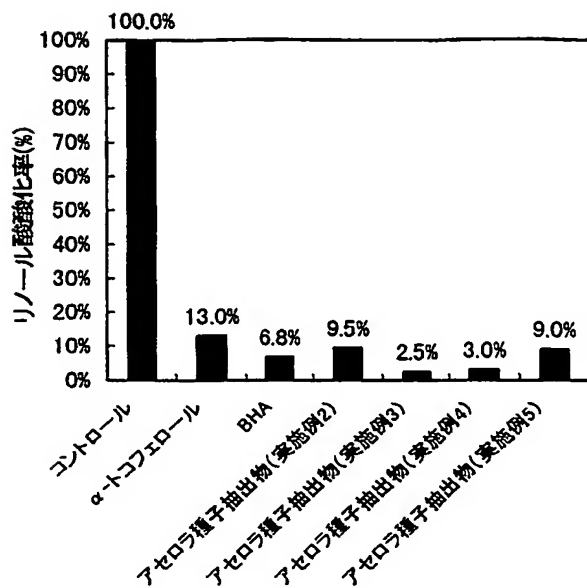


【図 2】

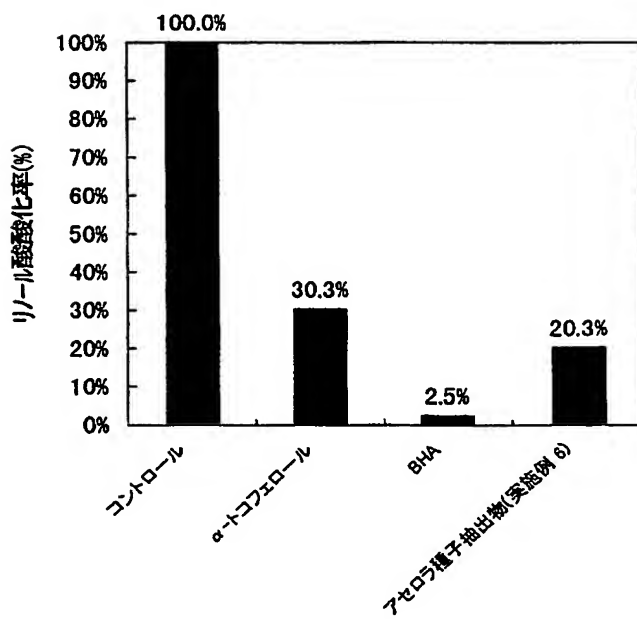


BEST AVAILABLE COPY

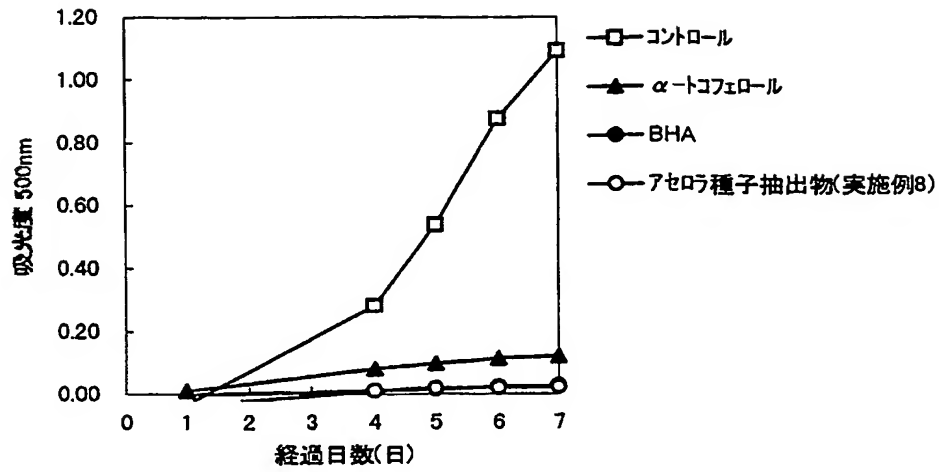
【図 3】



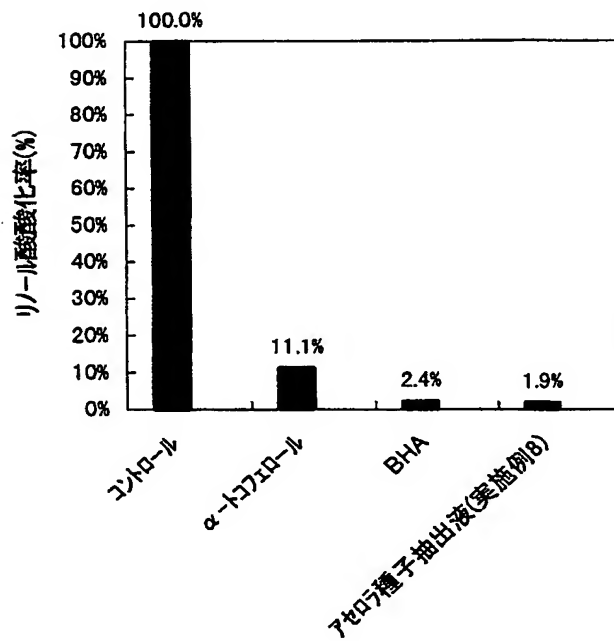
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来、そのほとんどが廃棄処理されていたアセロラ種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、皮膚外用剤、化粧品や食料品等に利用して優れた抗酸化作用、コラゲナーゼ阻害活性やヒアルロニダーゼ阻害活性を示す抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤、並びにこれらを含む皮膚外用剤、化粧品又は食料品を提供すること。

【解決手段】 本発明の抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤は、アセロラ種子の抽出物を有効成分として含み、本発明の化粧品はこれらの少なくとも1種を、本発明の食料品は、本発明の抗酸化剤を含むことを特徴とする。

【選択図】 なし

特願 2002-341191

出願人履歴情報

識別番号

[000134970]

1. 変更年月日

1991年 5月31日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区築地 6 丁目 19 番 20 号

氏 名

株式会社ニチレイ